

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

Rec'd PCT/PTO

10 MAR 2005

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月25日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024912 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/15, 1/21, 9/10

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011473

(22) 国際出願日: 2003年9月9日 (09.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-263834 2002年9月10日 (10.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒460-0003 愛知県名古屋市 中区錦一丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 結城 健介 (YUUKI, Kensuke) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県 各務原

市 須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 鷺津 欣也 (WASHIZU, Kinya) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県 各務原市 須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP).

(74) 代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県 名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSGLUTAMINASE-PRODUCING STRAIN

(54) 発明の名称: トランスグルタミナーゼ生産菌

(57) Abstract: It is intended to provide a strain capable of producing transglutaminase at a high efficiency; and a process for producing transglutaminase by using this strain. A structural gene originating from *Streptomyces mobaraensis* and a promoter and a terminator acting on this structural gene are externally transferred into *Streptomyces mobaraensis* to give a transformant. Transglutaminase is produced by culturing this transformant.(57) 要約: トランスグルタミナーゼを高効率で生産し得る菌株、及び該菌株を用いたトランスグルタミナーゼの生産方法を提供する。ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターをストレプトマイセス・モバラエンシスに外来的に導入して形質転換体を得る。この形質転換体を培養してトランスグルタミナーゼを生産する。

WO 2004/024912 A1

明 細 書

トランスグルタミナーゼ生産菌

5 技術分野

本発明は放線菌由来のトランスグルタミナーゼを生産する菌株、及び該菌株を利用したトランスグルタミナーゼの生産方法に関する。

背景技術

- 10 トランスグルタミナーゼはペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素であり、特にタンパク質中のリジン残基の ε -アミノ基とタンパク質分子内及び分子間に ε -(γ -Gln)-Lys 架橋結合を形成する。この性質を利用して当該酵素は食品分野、医薬分野等においてタンパク質の加工に広く用いられている。

15

- 古くからトランスグルタミナーゼは動物由来のものが知られていた。例えばモルモットの肝臓や哺乳動物の臓器、血液に広く分布していることが報告されており (Connellan, et al., Journal of Biological Chemistry 246 巻 4 号, 1093-1098 (1971)、Folk et al., Advances in Enzymology 38 巻, 109-191 (1973)、
20 Folk et al., Advances in Protein Chemistry 31 巻, 1-133 (1977))、その酵素の特徴についても研究されている。一方、放線菌からは上記動物由来のトランスグルタミナーゼとは性質が異なる、カルシウム (Ca^{2+}) 非依存性のトランスグルタミナーゼが発見されている。具体的にはストレプトマイセス・モバラエンス (*Streptomyces mobaraensis*) [旧称: ストレプトベルチシリウム・モバラエンス
25 (*Streptoverticillium mobaraense*)] IF013819 (特開昭 64-27271 号公報)、スト

レプトマイセス・グリセオカルネウス (*Streptomyces griseocarneus*) [旧称: ス
トレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptovercicillium*
griseocarneum)] IF012776、ストレプトマイセス・シナモネウス (*Streptomyces*
cinnamoneus) [旧称: ストレプトベルチシリウム・シナモネウム
5 (*Streptovercicillium cinnamoneum*)] IF012852 (特開 2001-186884 号公報) 等
からトランスグルタミナーゼが単離、同定されている。

発明の開示

従来トランスグルタミナーゼは自然界に存在する動物、菌類等から抽出、分離
10 等を経て製造されていたため、供給量、供給費用等の点で改善すべき点が多くあ
った。一方、微生物由来のトランスグルタミナーゼについては遺伝子組換え操作
を利用した生産方法の研究が精力的に行われている。しかしながら、遺伝子組換
え操作を利用した最初の報告 (Biosci. Biotech. Biochem., 58, 82-87 (1994)、特開
平 5-199883 号公報) によればその生産量は 0.1mg/l 程度であって工業的生産レベ
15 ルには程遠いものであった。また、最近の報告 (特開 2001-186884 号公報) によれ
ばある程度は生産レベルが向上しているものの、2 週間の微生物培養によって 40
~ 50mg/l 程度の生産性しか示さず、十分な生産性とは言い難い。

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであって、トランスグルタミナーゼを
高効率で生産し得る菌株、及び該菌株を用いたトランスグルタミナーゼの生産方
20 法を提供することを課題とする。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。即ち、放線菌由来のト
ランスグルタミナーゼを発現させる場合において、トランスグルタミナーゼ構造
遺伝子、プロモーター、ベクター、及び宿主放線菌の組合せを検討した。その結
25 果、トランスグルタミナーゼの生産性の極めて高い形質転換体を取得することに

成功し、本発明を完成するに至った。本発明は次の構成を提供する。

〔１〕 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔２〕 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、〔１〕に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔３〕 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、〔１〕又は〔２〕に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔４〕 前記構造遺伝子が配列番号１の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔５〕 外来的に導入した配列番号２の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔６〕 ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株の形質転換体である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

〔７〕 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスを、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び

產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、

を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

〔８〕 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、〔７〕に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

5 〔９〕 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、〔７〕又は〔８〕に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

10 〔１０〕 前記構造遺伝子が配列番号１の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、〔７〕～〔９〕のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

 〔１１〕 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、外来的に導入された配列番号２の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、〔７〕～〔９〕のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

15 〔１２〕 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株の形質転換体である、〔７〕～〔１１〕のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

20 〔１３〕 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

 〔１４〕 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、〔１３〕に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

25 〔１５〕 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来ト

ランスグルタミナーゼのターミネーターである、[13]又は[14]に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[16] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[13]~[15]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[17] 外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[18] ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、[13]~[17]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[19] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来ランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) を、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び

産生されたランスグルタミナーゼを回収する工程、

を含んでなるランスグルタミナーゼの生産方法。

[20] 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来ランスグルタミナーゼのプロモーターである、[19]に記載のランスグルタミナーゼの生産方法。

[21] 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来ランスグルタミナーゼのターミネーターである、[19]又は[20]に記載のランスグルタミナーゼの生産方法。

[22] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された

配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[19]～[21]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

5 [23] 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、[19]～[21]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[24] 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、[19]～[23]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

10

図面の簡単な説明

図1は実施例におけるシャトルベクターpSV1の構築方法を示す図である。

図2はトランスグルタミナーゼ遺伝子を保有する分泌発現プラスミド pUJ51BDの構築方法を示す図である。

15 図3は実施例において決定されたトランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を示した図である。

図4は、トランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子のプロモーター領域及び構造遺伝子の一部の塩基配列を示した図である。

20 図5は、トランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子の構造遺伝子の一部及びターミネーター領域の塩基配列を示した図である。

図6は形質転換体 ABL-1 及び ABM-1 の培養上清中における BTG 量を測定した結果をまとめた表である。

図7は形質転換体 ABL-1 及び ABM-1 の培養上清を電気泳動した結果 (銀染色後のゲル) を示す図である。レーン1、2、3、4、及び5はそれぞれストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) 3131-TS の培養上清、ABL-1 の培養上清、

25

精製 BTG、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*S. mobaraensis*) S-8112 の培養上清、及び ABM-1 の培養上清をアプライしたレーンである。レーン M は分子量マーカー (Pharmacia) をアプライしたレーンである。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の構成を詳細に説明する。本発明では、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体である放線菌 (ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス) が提供される。

ここでのトランスグルタミナーゼの構造遺伝子は、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来である限りその種類は特に限定されない。例えばストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 が保有するトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を用いることができる。構造遺伝子の具体例としては配列番号 1 の塩基配列からなる DNA を挙げることができる。尚、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 は受託番号 F E R M P - 1 8 9 8 0 で以下の国際機関に寄託されている。

国際寄託機関

名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

住所：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 中央第 6

20 寄託日：平成 1 4 年 (2 0 0 2 年) 8 月 2 0 日

トランスグルタミナーゼの構造遺伝子は例えば次のようにして取得することができる。即ち、ストレプトマイセス・モバラエンシスの染色体 DNA ライブラリーを構築し、このライブラリーをトランスグルタミナーゼの構造遺伝子に特異的な
25 プローブを用いてスクリーニングする。そして、選択されたクローンから制限酵

素処理によって挿入された DNA 断片を取得する。尚、PCR 法等を利用した公知の合成方法によってもトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を調製することができる。

- 5 配列番号 1 に記載される DNA の一部が改変された DNA (以下、「改変 DNA」ともいう) であっても、それがコードするタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性を有する限り本発明における構造遺伝子として利用できる。尚、ここでのトランスグルタミナーゼ活性の程度はできるだけ高い方が好ましい。例えば、配列番号 1 の配列からなる DNA がコードするタンパク質のトランスグルタミナーゼ活性と同
10 等であることが好ましい。

- 改変 DNA の具体例としては、配列番号 1 の配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を挙げることができる。尚、ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアルデヒド、10×SSC (0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt 溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 μg/ml の変性サケ精子 DNA、50mM リン酸バッファー (pH7.5)) を用いて 42℃でインキュベーションし、その後 0.1
15 ×SSC、0.1% SDS を用いて 68℃で洗浄する条件である。更に好ましいストリンジェントな条件としては、ハイブリダイゼーション液として 50%ホルムアルデヒド、5×SSC (0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt 溶液、1% SDS、10%デキストラン硫酸、10 μg/ml の変性サケ精子 DNA、50mM リン酸バッファー (pH7.5)) を用いる条件を例示することができる。
- 20

5 5 改変 DNA の他の例として、配列番号 1 に示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を挙げることができる。塩基置換などの変異は複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは変異の対象となる塩基がコードするアミノ酸の種類や位置などによっても異なるが、2～40 個、好ましくは 2～20 個、より好ましくは 2～10 個である。尚、このような改変には 5' 末端、3' 末端、又はその他の部位への制限酵素切断配列の導入や、シグナルペプチドをコードする配列の付加などが含まれる。

10 10 以上のような改変 DNA は、例えば部位特異的変異法を用いて、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように配列番号 1 の配列を有する DNA を遺伝子工学的に改変することによって得られる。また、トランスグルタミナーゼ遺伝子を保有するストレプトマイセス・モバラエンシスを紫外線で処理し、その後改変されたトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を単離することなど、公知の変異処理を利用した方法によっても取得することができる。

15 15 尚、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等の変異にはストレプトマイセス・モバラエンシスの個体差に基づく場合等、天然に生じる変異も含まれる。

20 20 例えば、天然に存在するストレプトマイセス・モバラエンシスがこのような改変 DNA を有する場合には、当該菌株からゲノム（染色体）DNA を抽出し、これを適当な制限酵素で処理した後に、配列番号 1 の DNA 又はその一部をプローブとしたスクリーニングにおいてストリンジントな条件でハイブリダイズする DNA を選択、単離することによって改変 DNA を得ることができる。

プロモーターは上記の構造遺伝子に作用するものが採用される。好ましくは、
ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーター
を採用する。更に好ましくは、使用される構造遺伝子と由来が同一のプロモーター
を採用する。例えば、上記のようにしてストレプトマイセス・モバラエンシ
5 スからトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構造遺伝子に
加えてそのプロモーター領域も含む DNA 断片を取得し、この DNA 断片を本発明に
おける構造遺伝子及びプロモーターとして用いることができる。

ターミネーターについても上記の構造遺伝子に作用するものが採用される。好
10 ましくは、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼの
プロモーターを採用する。更に好ましくは、使用される構造遺伝子と由来が同一
のターミネーターを利用する。例えば、上記のようにしてストレプトマイセス・
モバラエンシスのトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構
造遺伝子に加えてそのターミネーター領域も含む DNA 断片を取得し、この DNA 断
15 片を本発明における構造遺伝子及びプロモーターとして用いることができる。

ここでプロモーター、構造遺伝子、及びターミネーターの全てが同一のストレ
プトマイセス・モバラエンシスに由来することが特に好ましい。このような態様
の例としては、配列番号 2 の配列を有する DNA 断片を含む宿主ストレプトマイセ
20 ス・モバラエンシスを用いる場合を挙げることができる。このような DNA 断片は、
例えば上記のようにしてストレプトマイセス・モバラエンシスからトランスグル
タミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構造遺伝子に加えてそのプロモ
ーター及びターミネーター領域も含むようにして調製することができる。

ここで、配列番号 2 の配列からなる DNA の一部が改変された DNA (改変 DNA) で
25 あっても、それがコードするタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性を有する

限り同様に利用することができる。尚、ここでのトランスグルタミナーゼ活性の程度はできるだけ高い方が好ましい。例えば、配列番号 2 の配列からなる DNA がコードするタンパク質のトランスグルタミナーゼ活性と同等であることが好ましい。

5

上記の配列番号 1 の DNA の場合と同様に、ここでの改変 DNA の具体例としては配列番号 2 の配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA や、配列番号 2 に示される塩基配列において 1 若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、
10 付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を挙げることができる。その他、改変の許容される範囲、改変 DNA の調製方法などについても配列番号 1 の DNA の場合と同様である。

15 上記の構造遺伝子、プロモーター、ターミネーターが外来的に導入された形質転換体である放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）は、当該構造遺伝子等を含有した発現ベクターで宿主放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）を形質転換することによって作製される。

20 形質転換に供されるストレプトマイセス・モバラエンシスとしては、例えばストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112（受託番号 F E R M P - 1 8 9 8 0）又はその変異株を用いることができる。他方、ストレプトマイセス・リビダンスとしては、例えばストレプトマイセス・リビダンス 3131（ATCC 35287）又はその変異株を用いることができる。変異株の作製には例えば紫外線照射等の公知の方法
25 法を用いることができる。

発現ベクターの構築には放線菌の形質転換に使用可能な市販のベクターなど、公知のベクターを利用することができる。例えば、pUC19、pBR322、pBluescript などの大腸菌を宿主とするプラスミドと、ストレプトマイセス・リビダンス 3131
5 が保有するプラスミド pIJ702 などの放線菌を宿主とするプラスミドとを組み合わせ
て発現ベクターを構築することができる。発現プラスミドの具体例を以下に示す。まず、pUC19 と pIJ702 を用いて大腸菌の複製開始点及び放線菌の複製開始
点を併せ持つシャトルベクターを構築する。一方で、ストレプトマイセス・モバ
ラエンシスからトランスグルタミナーゼのプロモーター、構造遺伝子、及びター
10 ミネーターを含む DNA 断片を単離し、pUC19 の適当な制限酵素サイトに挿入する。
次に、このプラスミドに pIJ702 及び上記のシャトルベクターを用いて tsr (チオ
ストレプトン耐性) 遺伝子を挿入し、大腸菌の複製開始点、Amp^r (アンピシリン
耐性) 遺伝子、放線菌の複製開始点、及び tsr (チオストレプトン耐性) 遺伝子、
並びにトランスグルタミナーゼのプロモーター、構造遺伝子、及びターミネー
15 ーを含む発現ベクターを得る。

ベクターを構築する際の制限酵素処理、DNA 断片の挿入等は常法により行うことができる。

尚、このようなストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに当該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネ
20 ーターを含む発現ベクターは、ストレプトマイセス・リビダンス及びストレプト
マイセス・モバラエンシス以外のストレプトマイセス属に属する微生物の形質転換にも利用できる。

以上のようにして構築した発現ベクターを用いた放線菌 (ストレプトマイセス
25 ス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス) の形質転換は、プロ

トプラスト化した宿主放線菌に発現ベクターを導入する方法で行うことができる。
このような形質転換を、宿主である放線菌が生育可能な条件下で行うことが好ましい。本発明者らが検討したところでは、このような方法によれば形質転換効率が顕著に上昇した。その他の条件、操作方法などは常法（例えば Turner ら方法（Gene, 36, 321-331 (1985)）において採用されるものを適宜選択して用いることができる。ここでの「宿主である放線菌が生育可能な条件」とは、放線菌の生育に必要とされる栄養素が反応液中に含有された条件をいい、具体的には例えば肉エキス、イーストエキス、及び／又はペプトン（ポリペプトン、トリプトンペプトン、カゼインペプトンなどを含む）が反応液中に含有された条件をいう。より高い形質転換効率を得るために、宿主のプロトプラスト化工程、及びプロトプラスト化した宿主へのベクターの導入工程の両者をこのような条件下で行うことがさらに好ましい。

形質転換体の選択は発現ベクターに予め組み込んだ *tsr* 遺伝子などの選択マーカーを利用して行うことができる。

15

選択された形質転換体、即ちストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、プロモーター、及びターミネーターが外来的に導入された宿主放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）を、トランスグルタミナーゼの構造遺伝子を発現可能な条件下で培養することによりトランスグルタミナーゼを産生させることができる。形質転換体の培養用の培地は炭素源、窒素源、及び必要に応じて無機塩化物（無機イオン）を含むものを用いることができる。形質転換体の生育を促進するために、ビタミン、アミノ酸などを添加した培地を用いることもできる。炭素原としては例えばグルコース、デンプン、デキストリン等を採用でき、窒素原としては例えばポリペプトン、イーストエキス、肉エキス等を採用でき、無機塩化物としては

25

リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム等を採用できる。

形質転換体を培養する際の培養温度は例えば 15℃～37℃の範囲であり、好ましくは 25℃～35℃の範囲である。また、培地の pH は例えば 5.0～8.0、好ましくは 6.0～7.5 に調整される。

形質転換体を所望時間培養した後の培養液又は菌体よりトランスグルタミナーゼを回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことによりトランスグルタミナーゼを取得することができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことによりトランスグルタミナーゼを取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

実施例

本実施例では、特に記載しない限り制限酵素およびその他の遺伝子操作用酵素として宝酒造株式会社または東洋紡績株式会社の製品を用いた。尚、酵素の反応条件等は添付の取り扱い説明書に従った。

〔実施例 1〕 放線菌用ベクター pIJ702 の取得

プラスミド pIJ702 を保有するストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 3131 (ATCC 35287) を以下の培地条件で 30℃、2 日間培養した。

YEME 培地 + 0.5%グリシン + 50 μ g/ml チオストレプトン

イースト・エキス 3g

ペプトン 5g

マルト・エキス 3g

5 塩化マグネシウム 1g

グルコース 10g

サッカロース 340g

グリシン 5g

50mg/ml チオストレプトン溶液（シグマ：ジメチルスルホキシド溶液）1ml

10 / L (pH7.0)

培養後の培地 200ml を遠心分離（12,000g、4℃、10 分間）し、得られた菌体を 50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、25% Sucrose（以下、「TE-Sucrose」という）10ml に懸濁した。次に 30mg/ml のリゾチーム（シグマアルドリッチジャパン社製）
15 を含む TE-Sucrose 2ml 及び 0.25mM EDTA 4ml を加え、これを 37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後 20% SDS 2ml を加え、さらに 5M NaCl 5ml を加えて穏やかに攪拌した後、0℃で 1 晩インキュベートした。

次に遠心分離（100,000g、4℃、40 分間）により得られた上清に 30% ポリエチ
20 レングリコール 6000 を終濃度 10% になるように加え、0℃で 4.5 時間インキュベートした。その後、遠心分離（900g、4℃、5 分間）し、沈殿を 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、50mM NaCl に溶解した。そして塩化セシウム 16.8g 及び 10mg/ml の濃度にエチジウムブロマイドを 10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA（以下、「TE」
25 という）に溶かして調整した溶液 1.2ml を加え、遠心分離（1,300g、室温、15 分間）により残さを取り除いた後、再び遠心分離（230,000g、20℃、12 時間）を

行った。遠心後、紫外線照射下でプラスミド DNA 層を得た。次に TE で飽和したブタノールによる抽出を行ってエチジウムブロマイドを除いた。この抽出を 3 回繰り返して行った。得られたプラスミド DNA 溶液は TE を透析外液として 4℃ で 1 晩の透析に供した。その後、TE 飽和フェノールで 1 回、クロロホルム・イソアミルアルコールで 2 回抽出処理を行った。次に、1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 溶液と 2 倍容量のエタノールを加え、-80℃ に 30 分間静置した。その後、遠心分離 (12,000g、4℃、15 分間) により沈殿を回収し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥させた。これを TE 200 μ l に溶かした。以上の操作によって最終的に得られた DNA 量は約 10 μ g であった。

10

【実施例 2】 pIJ702 を保有するストレプトマイセス・リビダンス 3131 (ATCC 35287) からのチオストレプトン感受性株の取得

pIJ702 を保有するストレプトマイセス・リビダンス 3131 (ATCC 35287) を YEME 培地で 30℃、7 日間培養した。次に、培養液を YEME 培地で $10^5 \sim 10^9$ 倍に希釈し、それぞれの希釈液を 100 μ l ずつ YEME 寒天培地 (YEME に 1.5% 寒天を加えたプレート寒天培地) 5 枚にまき、30℃ で 1 週間培養した。培養後 RepliPlate™ Colony Transfer Pad (宝酒造株式会社製) を用い、200 μ g/ml チオストレプトンを含む YEME 培地にレプリカし、30℃ で 1 週間培養した。そしてプラスミド pIJ702 を脱落してチオストレプトン感受性となった株を選択し、これをストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS とした。これを後の形質転換の宿主として用いた。

20

【実施例 3】 シャトルベクター pSV1 の取得

シャトルベクター pSV1 を図 1 に示す方法で構築した。まず、大腸菌用ベクター pUC19 (宝酒造株式会社製) を制限酵素 *Bam*HI で消化した DNA 断片と、放線菌用ベクター pIJ702 を *Bcl*I (宝酒造株式会社製) で消化して得られる *tsr* を含む DNA

25

断片を用意し、これらを DNA Ligation Kit (宝酒造株式会社製) を用いて連結することにより pUCTSR を作製した。次に pUCTSR を *KpnI*、*ClaI* (宝酒造株式会社製) で消化して得られる DNA 断片 (長断片) と、pIJ702 を *KpnI*、*ClaI* (宝酒造株式会社製) で消化して得られる DNA 断片 (短断片) を用意し、これらを DNA Ligation
5 Kit (宝酒造株式会社製) を用いて連結した後、大腸菌 DH5 株 (東洋紡株式会社) に形質転換した。こうして得られた形質転換体を持つ pUC19 断片と pIJ702 断片が連結したプラスミドをシャトルベクター pSV1 とし、後の操作に用いた。

【実施例 4】 トランスグルタミナーゼ分泌発現プラスミド pUJ51BD の作製

10 トランスグルタミナーゼ遺伝子を保有する分泌発現プラスミド pUJ51BD を図 2 に示す方法で構築した。まず、ストレプトマイセス モバラエンシス S-8112 (受託番号 FIRM P-18980) から単離されたトランスグルタミナーゼ (以下、「BTG」ともいう) 遺伝子 *BamHI* 断片を含むファージ DNA (λ BTG、特開平 5-199883 号公報) から約 6.6kb の *BglIII*-*BamHI* 断片を切り出して pUC19 の *BamHI* サイト
15 に挿入したプラスミド pBTG-BB を作製した。pBTG-BB から 3' の不要な領域を Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (宝酒造株式会社製) を用いて欠失させ、約 3.9kb の BTG 遺伝子を含むプラスミド pU51B を作製した。次に pU51B の *PstI* サイトに放線菌用ベクター pIJ702 の *PstI* 消化 DNA 断片を挿入したプラスミド pUJ51B を作製した。pUJ51B から *XbaI*-*ClaI* 断片を切り出し、実施例 3 で得た大腸菌-放線菌シャ
20 トルベクター pSV1 の *XbaI*-*ClaI* 断片と置換することで pIJ702 由来の *mel* (チロシナーゼ) 遺伝子を除去した BTG 分泌発現プラスミド pUJ51BD を構築した。

【実施例 5】 プロモーター領域の塩基配列解析

BTG の構造遺伝子の配列 (配列番号 1) から塩基配列解析用の合成プライマー B
25 B-23 [インヴィトロジェン (株)] 5'-ACACCGCACTCATAGTGGCG-3' (配列番号 3) を合

成した。プロモーター領域の 3' 側からプライマー BB-23 を用いて、5' 側から M13-RV (宝酒造株式会社製) を用いてプラスミド pBTG-BB の塩基配列を解析した。得られた塩基配列解析の結果から更に合成プライマー BB-19 5'-TCCGTGCGAGTGGAAGAACG-3' (配列番号 4)、SP6-20 5'-GACGGCCTCCGAATAAC-3' (配列番号 5) を合成し、
5 これらを用いたプライマーウォーキングによりプロモーター領域約 700bp の全塩基配列を決定した (図 3)。同様に、合成プライマー SP6-32 5'-ATGTCGAGGGACAGGAAC-3' (配列番号 6) と SP6-36 5'-CACCACGAAAGTCGCTAC-3' (配列番号 7) を用いたプライマーウォーキングにより約 500bp のターミネータ領域の塩基配列を決定した。その結果、プロモーター領域、構造遺伝子、及びターミネータ領域から
10 なる塩基配列 (配列番号 2) が同定された (図 4、図 5)。尚、Sequence 反応は BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit (アプライド・バイオシステムズ) を用い、解析は ABI PRISM 310 シークエンサー (アプライド・バイオシステムズ) を使用した。

15 【実施例 6】 ストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS プロトプラストの調製

実施例 2 で取得したストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS を YEME 培地 (0.5% グリシン) で 30℃、2 日間培養した。培養後の培地 200ml を遠心分離 (1,300g、室温、10 分間) し、得られた菌体を 0.35M サッカロース溶液 72ml に懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離 (1,300g、室温、10 分間) し、菌体を 1mg/ml のリゾチーム (シグマアルドリッチジャパン社) を含む P 緩衝液 60ml に再懸濁し、
20 これを 30℃、2.5 時間インキュベートした。インキュベート後の懸濁液を脱脂綿でろ過して残さを取り除いた。次に得られたろ液を遠心分離 (1,300g、室温、10 分間) し、沈渣を P 緩衝液 25ml で洗浄した。この洗浄を 2 回繰り返した後、沈殿を P 緩衝液 1ml に懸濁し、これをプロトプラスト懸濁液とした。

25 P 緩衝液

TES[N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulphonic acid] 5.73g

サッカロース 103g

塩化マグネシウム 2.03g

硫酸カリウム 0.5g

5 塩化カルシウム 3.68g

Trace element solution 2ml/L (pH7.4)

尚、1%リン酸一カリウム溶液を別に調製し、これを使用直前に 100ml P 緩衝液
当たり 1ml 加えた。

Trace element solution

10 塩化亜鉛 40mg

塩化第二鉄 200mg

塩化第二銅 10mg

塩化マンガン 10mg

四硼酸ナトリウム 10mg

15 モリブデン酸アンモニウム 10mg/L

[実施例 7] ストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS の形質転換

以下の各溶液を混合し、全量 140 μ l とした。

BTG 分泌発現プラスミド pUJ51D の DNA 溶液 20 μ l

20 ストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS プロトプラスト 100 μ l

0.35M サッカロース溶液 20 μ l

次に、20%ポリエチレングリコール 1000 を含む P 緩衝液を 1.5ml 加えピペッテ
ィングにより穏やかに混合し室温で 2 分間静置した。この混合液を遠心分離 (1,
700g、室温、10 分間) し、沈殿を集めた。沈殿として得られたプロトプラストを

25 P 緩衝液で 2 回繰り返し洗浄した。ペレットを 1ml の P 緩衝液に再懸濁した後に、

200 μ l ずつ R-2 培地に塗布した。

一方、以下に示した R-2/A 及び R-2/B を別調製した。

R-2/A

	硫酸カリウム	0.5g
5	塩化マグネシウム	20.2g
	塩化カルシウム	5.9g
	グルコース	20.0g
	プロリン	6.0g
	カザミノ酸	0.2g
10	Trace element solution	4.0ml
	寒天	44.0g/L

R-2/B

	TES	11.5g
15	イースト・エキス	10.0g
	サッカロース	203g/L (pH7.4)

プレート培地作製時に R-2/A、R-2/B を混合し、更に 1% KH_2PO_4 を最終容量 20
0ml あたり 1ml の割合で混合した。これらを 30℃ で 18 時間インキュベートした。
その後、200 μ g/ml チオストレプトン及び 400 μ g/ml チロシンを含む P 緩衝液 1m
20 l を加え、プレートの表面を覆った。更に 7 日間プレートを 30℃ でインキュベ
ートしチオストレプトン耐性を獲得した形質転換体 (ABL-1) を得た。

【実施例 8】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*)
のプロトプラストの調製

25 前培養としてストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 を YEME 培地 + 1%

グルコース+25mM 塩化マグネシウム (pH7.0) で 27℃、3 日間培養した。次に、YE
ME 培地+1% グルコース+4mM 塩化マグネシウム+1% グリシン (pH7.0) に前培
養後の培養液を 0.5% 接種した後、27℃で 3 日間培養した。培養後の培地を遠心
分離 (3,000g、4℃、10 分間) し、得られた菌体の湿重量を測定した。湿菌体 0.
5 6g に対し 10ml の 0.3M サッカロース溶液で洗浄操作後、再び遠心分離 (3,000g、
4℃、10 分間) し、菌体を 0.4mg/ml のリゾチーム (日本ロッシュ株式会社製) と
0.1mg/ml のアクロモペプチダーゼ (和光純薬工業株式会社製) を含む BS-L 緩衝
液 4ml に懸濁して 30℃、30 分間穏やかに攪拌した。次に水中で BS-P 緩衝液 5ml
を加え、BS-P 緩衝液 3ml で洗浄しながら脱脂綿を用いてろ過した。得られた懸濁
10 液を遠心分離 (1,500g、4℃、5 分間) し、BS-P 緩衝液 10ml で再懸濁後、再び遠
心分離 (1,500g、4℃、5 分間) した。得られた沈殿を BS-P 緩衝液 0.5ml で再懸
濁した溶液をプロトプラスト懸濁液として後述の形質転換に使用した。

BS-L 緩衝液

15	10% 肉エキス	10ml
	イーストエキス	1g
	ペプトン	2g
	グルコース	10g
	サッカロース	171.15g
20	塩化カルシウム	0.277g
	塩化マグネシウム	0.508g/L (pH7.0)

BS-P 緩衝液

	10% 肉エキス	10ml
25	イーストエキス	1g

	ペプトン	2g
	グルコース	10g
	サッカロース	171.15g
	塩化カルシウム	2.77g
5	塩化マグネシウム	2.03g/L (pH7.0)

【実施例 9】 ストレプトマイセス・モバラエンシスの形質転換

実施例 8 で得られたプロトプラスト懸濁液（プロトプラスト濃度 $1 \times 10^9 / \text{ml}$ ）を $100 \mu\text{l}$ と実施例 4 で得られた BTG 分泌発現プラスミド pUJ51D $1 \mu\text{g}$ を含む 2M

10 サッカロース溶液 $10 \mu\text{l}$ を混合した後、直ちに氷中に 10 秒間静置し、続いて 25% ポリエチレングリコール 1000（シグマアルドリッチジャパン社製）を含む P 緩衝液 0.5ml を加えた後、直ちに氷中に 1 分間静置し、続いて BS-P 緩衝液を 2ml 加えた後、直ちに遠心分離（ $1,500 \text{g}$ 、 4°C 、10 分間）した。得られた沈殿を BS-P 緩衝液 0.5ml で懸濁し、 0.1ml ずつ SBS 寒天培地に分注し、SBS 軟寒天培地 3ml を用いて

15 攪拌しながら重層した。ふたを開けて正確に 2 時間乾燥した後、 27°C で正確に 24 時間培養した。更に $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ チオストレプトンを含む SBS 軟寒天培地 3ml を重層して 27°C で培養した。以上の操作の結果得られた形質転換体を ABM-1 とした。

20 SBS 寒天培地 (pH7.0)

	肉エキス	10g
	イーストエキス	7.5g
	トリプトンペプトン	1g
	グルコース	10g
25	サッカロース	308.07g

寒天 25g/L (pH7.0)

SBS 軟寒天培地 (pH7.0)

	肉エキス	10g
	イーストエキス	7.5g
5	トリプトンペプトン	1g
	グルコース	10g
	サッカロース	308.07g
	シーブラークアガロース	25g/L (pH7.0)

10 【実施例 10】 BTG 遺伝子を組み込んだ形質転換体の培養

実施例 7 で得られた形質転換体 ABL-1、及び実施例 9 で得られた形質転換体 AB
M-1 をそれぞれ以下の培地条件で 30℃、7 日間培養した。

	ポリペプトン	20g
	可溶性デンプン	20g
15	イーストエキス	2g
	リン酸二カリウム	2g
	硫酸マグネシウム	1g
	アデカノール LG126	0.5g
	50mg/ml チオストレプトン溶液	0.5ml/L (pH7.0)

20

上記条件下で培養した後の培地を遠心分離 (12,000g、4℃、10 分間) し、得ら
れた上清を以下の ELISA 法に供した。

【実施例 11】 BTG 生産量の定量 (ELISA 法)

25 ストレプトマイセス・モバラエンス S-8112 の培養上清から Blue Sepharose

CL-6B (Pharmacia) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより得た精製 BTG を抗原としてウサギを免疫することにより作製された抗 BTG 抗体を用いた ELISA 法によって、実施例 10 で得られた培養上清中の BTG 量を定量した。

まず、96 穴マイクロプレートの各ウェルに PBS 緩衝液で希釈した抗 BTG 抗体溶
5 液を 100 μ l ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートして抗体をプレートに固定
化した。抗体溶液を除いた後、0.1% Tween20 を含むブロックエース（大日本製
薬株式会社製）の 10 倍希釈液（以下、「洗浄液」という）200 μ l を用いて各ウェ
ルを洗浄した。洗浄操作は続けて 3 回行った。次にブロックエース 4 倍希釈液 20
0 μ l を各ウェルに分注し、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートしてブロッキングを行っ
10 た。ブロックエース 4 倍希釈液を除去した後、各ウェルを洗浄液で 3 回洗浄した。
次に測定サンプルである培養上清（ABL-1 又は ABM-1 の培養上清）をブロックエ
ースの 10 倍希釈液で適宜希釈し、希釈液を各ウェルに 50 μ l ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、
1 時間インキュベートした。尚、スタンダードとしては、精製 BTG をブロックエ
ースの 10 倍希釈液でそれぞれ異なる濃度に調製したものを用意し、測定サンプル
15 と同様にブロッキング処理後のウェルに添加した。

各ウェルからサンプル溶液を除去した後、各ウェルを洗浄液で 3 回洗浄した。
次に抗 BTG 抗体 Fab' 断片にホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (HRP) を架橋さ
せた Fab'-HRP を含むブロックエース 10 倍希釈液 100 μ l を各ウェルに分注し、3
7 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。その後、Fab'-HRP 溶液を除いた後、各ウェルを
20 洗浄液で 3 回洗浄した。次に 0.04% オルトフェニレンジアミン (o-PDA)、0.42%
過酸化水素液を含む 50mM クエン酸ナトリウム溶液 (pH4.5) を各ウェルに 150 μ l
ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C でインキュベートすることにより o-PDA と過酸化水素を HRP で
反応させて発色させた。反応開始から正確に 20 分後に、反応の停止液として 3M
硫酸溶液を各ウェルに 50 μ l ずつ分注した後、各ウェルの波長 492nm における吸
25 光度を測定した。そして、スタンダードの吸光度から求めた標準曲線を用いて各

培養上清 ABL-1 又は ABM-1) 中の BTG 量を求めた。各培養上清あたりの BTG 量を図 6 の表に示す。この表に示されるように ABL-1 では 0.7g/L、ABM-1 では 0.5g/L もの BTG が生産された。既報の生産性 (40mg/L~50mg/L) と比較すれば、ABL-1 では 10 倍以上、ABM-1 では約 10 倍の生産性が得られたこととなり、極めて高い

5 効率で BTG の生産を行えることが確認された。

PBS 緩衝液

	塩化ナトリウム	8.0g
	リン酸二ナトリウム	1.1g
10	塩化カリウム	0.2g
	リン酸一カリウム	0.2g/L (pH7.4)

[実施例 1 2] SDS-PAGE

形質転換体 ABL-1 及び形質転換体 ABM-1 の培養上清をそれぞれ電気泳動用 2xSDS
15 S 緩衝液と 1:1 の割合で混合し、SDS-PAGE 用サンプルとした。尚、対照 (コントロール) として、ストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS の培養上清、精製 BTG をバッファで希釈したもの、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 の培養上清を用意した。各サンプルを 12.5%ゲルを用いた SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE にはファルマシア・バイオテックのファストシステムを用い、染色は銀染色と
20 した。染色後のゲルの写真を図 7 に示す。図 7 においてレーン 1、2、3、4、及び 5 はそれぞれストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) 3131-TS 培養上清、ABL-1 の培養上清、精製 BTG、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*S. mobaraensis*) S-8112 の培養上清、及び ABM-1 の培養上清をアプライしたレーンである。また、レーン M は分子量マーカー (Pharmacia) をアプライしたレーンで
25 ある。

図 4 に示されるように、ABL-1（レーン 2）及び ABM-1（レーン 5）では精製 BTG（レーン 3）とほぼ同じ位置にはっきりとしたバンドが観察され、BTG が高濃度で含有されていることが判る。一方、ストレプトマイセス・リビダンス（*S. lividans*）3131-TS の培養上清（レーン 1）及びストレプトマイセス・モバラエンシス（*S. mobaraensis*）S-8112 の培養上清（レーン 4）では精製 BTG と認められるバンドは観察されない。このことから、ABL-1 及び ABM-1 では特異的に BTG の産生が行われていることが判る。

2xSDS 緩衝液

	トリス塩酸塩	2.42g
10	EDTA	0.744g
	SDS	50g
	β -メルカプトエタノール	100ml/L (pH8.0)

本発明は、上記発明の実施の形態の説明に何ら限定されるものではなく、特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

以下、次の事項を開示する。

（1） ストレプトマイセス・モバラエンシス（*Streptomyces mobaraensis*）由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含有するベクターで宿主ストレプトマイセス・モバラエンシスを形質転換する工程、

前記構造遺伝子を発現可能な条件で形質転換体を培養する工程、及び
産生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

(2) 前記形質転換する工程が、前記宿主ストレプトマイセス・モバラエンスが生育可能な条件で行われる(1)に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(3) 前記ベクターがプラスミド pIJ702 を改変したプラスミドからなる、(1) 又は(2)に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(4) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(1)～(3)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(5) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(1)～(4)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(6) 前記宿主ストレプトマイセス・モバラエンスが、ストレプトマイセス・モバラエンス S-8112 又はその変異株である、(1)～(5)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(7) 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(1)～(6)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(8) 前記形質転換体が、外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、(1)～(6)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(11) ストレプトマイセス・モバラエンス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含有するベクターで宿主ストレプトマイセス・リ

ビダンスを形質転換する工程、

前記構造遺伝子を発現可能な条件で形質転換体を培養する工程、及び
產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

- 5 (12) 前記形質転換する工程が、前記宿主ストレプトマイセス・リビダンスが生育可能な条件で行われる、(11)に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(13) 前記ベクターがプラスミド pIJ702 を改変したプラスミドからなる、
(11)又は(12)に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

- 10 (14) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(11)～(13)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

- (15) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(11)～(14)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。
- 15

(16) 前記宿主ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株である、(11)～(15)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

- (17) 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(11)～(16)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。
- 20

(18) 前記形質転換体が、外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、(11)～(16)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

25

(21) ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含む発現ベクター。

- 5 (22) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(21)に記載の発現ベクター。

(23) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(21)又は(22)に記載の発現ベクター。

- 10 (24) 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(21)~(23)のいずれかに記載の発現ベクター。

(25) 配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する発現ベクター。

- 15 (26) (21)~(25)のいずれかの発現ベクターで形質転換された、ストレプトマイセス属に属する微生物。

- (31) 宿主放線菌をそれが生育可能な条件下でプロトプラスト化する工程、前記宿主放線菌が生育可能な条件下で、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含む発現ベクターを宿主放線菌に導入する工程、を含む放線菌の形質転換方法。
- 20

- (32) 前記宿主放線菌がストレプトマイセス・リビダンス又はストレプトマイセス・モバラエンシスである、ことを特徴とする(31)に記載の形質転換方法。
- 25

産業上の利用の可能性

本発明によりトランスグルタミナーゼの生産性が極めて高い放線菌が提供される。当該放線菌を用いることによりトランスグルタミナーゼの効率的な生産を行

5 うことができる。

請 求 の 範 囲

1. ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。
5
2. 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求の範囲第1項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。
10
3. 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求の範囲第1項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。
15
4. 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求の範囲第1項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。
- 20 5. 外来的に導入した配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。
6. ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株の形質転換体で
25 ある、請求の範囲第1項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス

ス。

7. ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モ

- 5 バラエンシスを、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び
産生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

8. 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグ
10 ルタミナーゼのプロモーターである、請求の範囲第7項に記載のトランスグルタ
ミナーゼの生産方法。

9. 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランス
グルタミナーゼのターミネーターである、請求の範囲第7項に記載のトランスグ
15 ルタミナーゼの生産方法。

10. 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列
であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求の範囲第7項
に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

20

11. 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、外来的に導入さ
れた配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグ
ルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、請求の範囲第7項
に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

25

1 2. 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株の形質転換体である、請求の範囲第 7 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

5 1 3. ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

10 1 4. 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求の範囲第 1 3 項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

15 1 5. 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求の範囲第 1 3 項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

20 1 6. 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求の範囲第 1 3 項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

1 7. 外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

18. ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、請求の範囲第 13 項に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

19. ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来
5 トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) を、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び
10 産生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

20. 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求の範囲第 19 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

15

21. 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求の範囲第 19 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

20 22. 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求の範囲第 19 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

23. 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、外来的に導入された
25 配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタ

ミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、請求の範囲第 19 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

24. 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・
- 5 リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、請求の範囲第 19 項に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

Fig.1

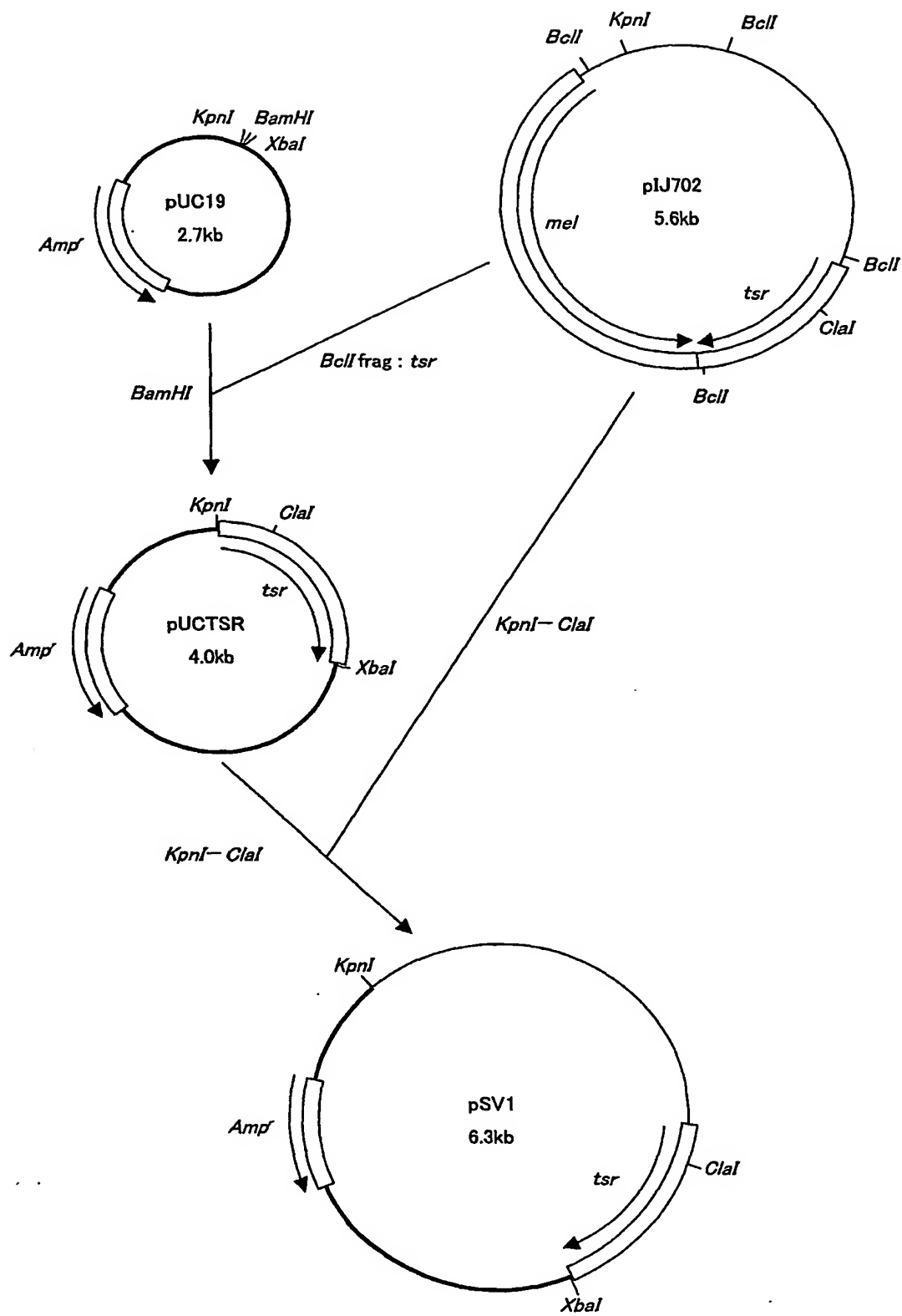


Fig.2

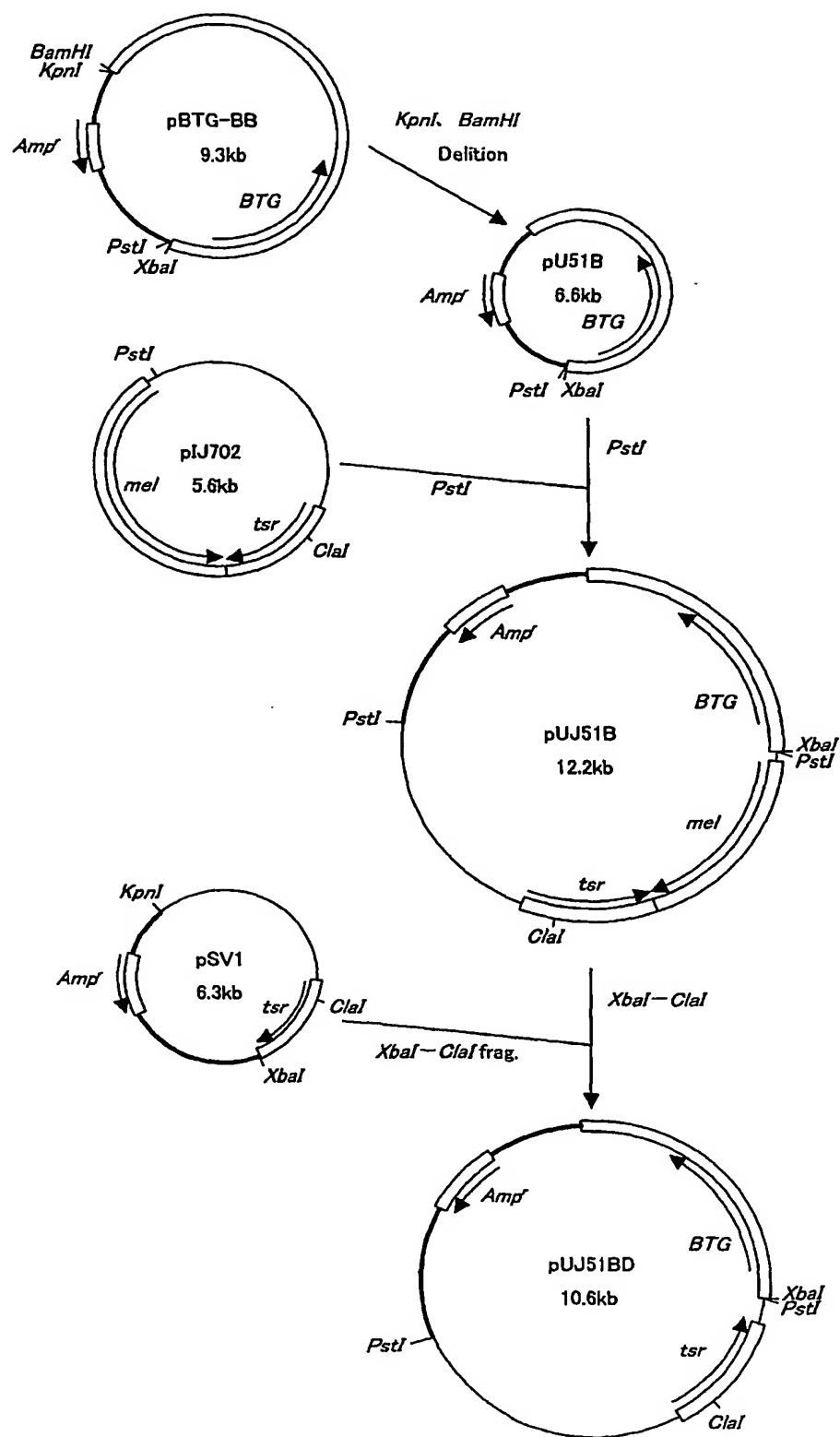


Fig. 3

Sequence Range: 1 to 669

```
      10      20      30      40      50      60
GATCTTCCGG GACATCTGAG GCGCCGGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCTGCGCGA

      70      80      90     100     110     120
AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCGGC

     130     140     150     160     170     180
GGCGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGGTCGGAGG GCGGCGCGGA TATCGTCCTT

     190     200     210     220     230     240
GGGGCGGGGT GGCCGGAATT GCCGCCATGG TGTGCGCGG GAATCGACCC GAAGACATGA

     250     260     270     280     290     300
TCACTTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCCGTGCCCC

     310     320     330     340     350     360
TGTCCGCGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCCAC TCGCACGGAC

     370     380     390     400     410     420
GGCCCCACAG GACCTTTCGG CCCGGGCTCG CCCC GCCGCC TCGGTGACGG CCTCCGAATA

     430     440     450     460     470     480
ACGCGGCCGC CGGGGCCTCG GCCGGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCCGGGCGGG

     490     500     510     520     530     540
CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CCGCCCGACA TCGGCTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT

     550     560     570     580     590     600
TCCCGCCTCC CGGCCGCGTT TTTCCGCCGC CGAAGGTGCG GCGACGCGTA CCGAATCCCC

     610     620     630     640     650     660
CTTCATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCCACGAC AAAGGAGTTG

CAGGTTTCC
```

Fig.4

GATCTTCCGG GACATCTGAG GCGCCGGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCTGCCGGA 60
 AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCCGC 120
 GGGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGGTCGGAGG GGGGGCCGGA TATCGTCCTT 180
 GGGGGGGGGT GGGCGGAATT GCCGCCATGG TGTTGCCGGG GAATCGACCC GAAGACATGA 240
 TCATTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCCGTGCCCC 300
 TGTCCGCGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCCAC TCGCACGGAC 360
 GGCCCCACAG GACCTTTCGG CCCGGGCTCG CCCC GCCGCC TCGGTGACGG CCTCCGAATA 420
 ACGCGGCCGC CGGGGCTCG GCCGGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCCGGGCGGG 480
 CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CGGCCCGACA TCGGTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT 540
 TCCCGCTCC CGGCCGCGTT TTCCGCCGC CGAAGGTGCG GCGACGCGTA CCGAATCCCC 600
 CTTATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCCACGAC AAAGGAGTTG 660
 CAGGTTTCC ATG CGC ATA CGC CGG AGA GCT CTC GTC TTC GCC ACT ATG AGT
 Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser>
 1 5 10

 720
 GCG GTG TTA TGC ACC GCC GGA TTC ATG CCG TCG GCC GGC GAG GCC GCC
 Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala>

 780
 GCC GAC AAT GGC GCG GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC
 Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr>

 840
 CGC CTC ACG GCG GAT GAC GTC GCG AAC ATC AAC GCG CTC AAC GAA AGC
 Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser>

 900
 GCT CCG GCC GCT TCG AGC GCC GGC CCG TCG TTC CGG GCC CCC GAC TCC
 Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser>
 GAC GAC AGG GTC ACC CCT CCC GCC GAG CCG CTC GAC AGG ATG CCC GAC
 Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp>

 960
 CCG TAC CGT CCC TCG TAC GGC AGG GCC GAG ACG GTC GTC AAC AAC TAC
 Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr>

 1020
 ATA CGC AAG TGG CAG CAG GTC TAC AGC CAC CGC GAC GGC AGG AAG CAG
 Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln>

 1080
 CAG ATG ACC GAG GAG CAG CGG GAG TGG CTG TCC TAC GGC TGC GTC GGT
 Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly>

 1140
 GTC ACC TGG GTC AAT TCG GGT CAG TAC CCG ACG AAC AGA CTG GCC TTC
 Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe>
 GCG TCC TTC GAC GAG GAC AGG TTC AAG AAC GAG CTG AAG AAC GGC AGG
 Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg>

 1200
 CCC CGG TCC GGC GAG ACG CGG GCG GAG TTC GAG GGC CGC GTC GCG AAG
 Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys>

 1260
 GAG AGC TTC GAC GAG GAG AAG GGC TTC CAG CGG GCG CGT GAG GTG GCG
 Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala>

Fig.5

1320
TCC GTC ATG AAC AGG GCC CTG GAG AAC GCC CAC GAC GAG AGC GCT TAC
Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr>

1380
CTC GAC AAC CTC AAG AAG GAA CTG GCG AAC GGC AAC GAC GCC CTG CGC
Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg>

AAC GAG GAC GCC CGT TCC CCG TTC TAC TCG GCG CTG CGG AAC ACG CCG
Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro>

1440
TCC TTC AAG GAG CGG AAC GGA GGC AAT CAC GAC CCG TCC AGG ATG AAG
Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys>

1500
GCC GTC ATC TAC TCG AAG CAC TTC TGG AGC GGC CAG GAC CGG TCG AGT
Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser>

1560
TCG GCC GAC AAG AGG AAG TAC GGC GAC CCG GAC GCC TTC CGC CCC GCC
Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala>

1620
CCG GGC ACC GGC CTG GTC GAC ATG TCG AGG GAC AGG AAC ATT CCG CGC
Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg>

AGC CCC ACC AGC CCC GGT GAG GGA TTC GTC AAT TTC GAC TAC GGC TGG
Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp>

1680
TTC GGC GCC CAG ACG GAA GCG GAC GCC GAC AAG ACC GTC TGG ACC CAC
Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His>

1740
GGA AAT CAC TAT CAC GCG CCC AAT GGC AGC CTG GGT GCC ATG CAT GTC
Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val>

1800
TAC GAG AGC AAG TTC CGC AAC TGG TCC GAG GGT TAC TCG GAC TTC GAC
Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp>

1860
CGC GGA GCC TAT GTG ATC ACC TTC ATC CCC AAG AGC TGG AAC ACC GCC
Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala>

CCC GAC AAG GTA AAG CAG GGC TGG CCG TGA TGTGAGC GGGGTGGAGG
Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro ***>

1920
GGAGCCGGTT GCCCGGCTCC CCTCCACCCT CTCCCCCGCC ACCACGAAAG TCGCTACAGC

1980
TCGTGTCCCG TCGTGCTGTC GACGTGCGCC GGGAGTTCGC CCTCGTGGCG GTCGCCCCGTC

2040
GTCGGGGTGC CCGTGGGTTT GAACATGAGG ATGGAGGCGC CCGGGGAGGA CGGCTTGTGT

2100
TCGGTGCCCT TGGGCACCAC GAAGGTGTGC CCCTTGTGCA GGCGCACCGT GTGTTCCGTT

2160
CCGTGGAGT CGCGGAGCGC CACGTGGAAG CGGCCGTCCA GGACGAGGAA GAACTCGTCG

2220
GTGTCTCTGT GGACGTGCCA GACGTGCTCG CCTCGGGTGT GGGCGACGCG GACGTGCTAG

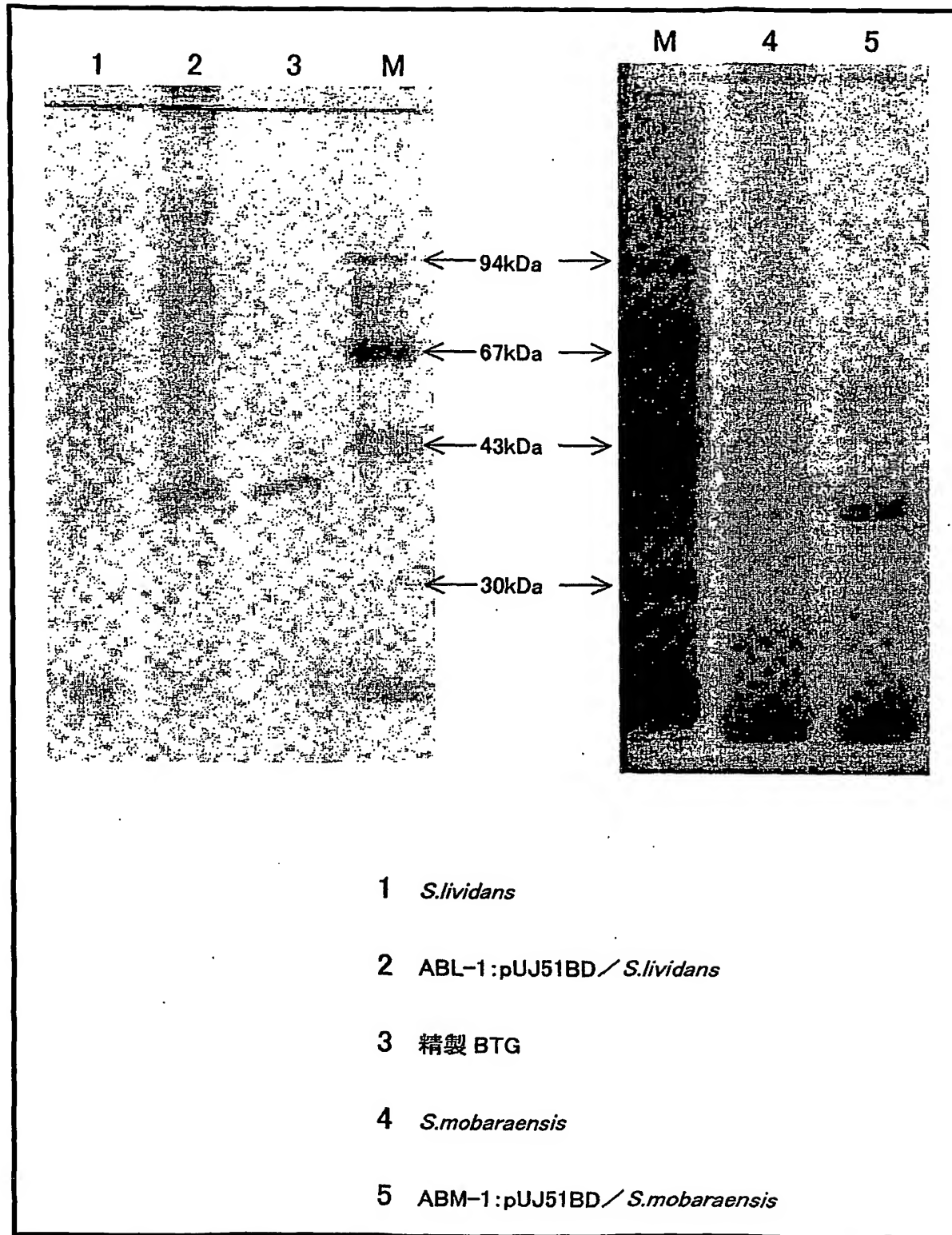
2280
TCGTTTCATG GGGCGACGAT GCGCGGGCTG TAGACGTCGT CGAAGGAGGC GAGGGCCTTG

2340
GCGAGGTTGA CGGGCTCGGT GTCGTTTCATG GTCCGAGTCT CGGCGGGAGC CCGCCGCGGC
GTC

Fig.6

	培養上清中の BTG 量
ABL-1:pUJ51BD / <i>S.lividans</i> 3131TS	0.7 g/L
ABM-1:pUJ51BD / <i>S.mobaraensis</i> S-8112	0.5 g/L

Fig.7



SEQUENCE LISTING

<110> AMANO ENZYME INC.
YUUKI, Kensuke
WASHIZU, Kinya

<120> Fungus producing transglutaminase

<130> P0201101

<150> JP P2002-263834

<151> 2002-09-10

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1224

<212> DNA

<213> Streptomyces mobaraensis

<220>

<221> source

<222> (1)..(1224)

<223> transglutaminase gene

<400> 1

atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc gccactatga gtcggtgttt atgcaccgcc	60
ggattcaigc cgtcggccgg cgaggccgcc gccacaatg gcgcggggga agagacgaag	120
tcctacgccg aaacctaccg cctcacggcg gatgacgtcg cgaacatcaa cgcgtcaac	180
gaaagcgctc cggccgcttc gagcgccggc ccgtcgticc gggccccga ctccgacgac	240
agggtcacc ctcgcccg gccgctcgac aggaigcccg acccgctaccg tccctcgac	300
ggcaggcccg agacggctgt caacaactac atacgaagt ggcagcaggt ctacagccac	360
cgcgacggca ggaagcagca gatgaccgag gagcagcggg agtggctgtc ctacggctgc	420
gtcgggtgtc cctgggtcaa ttgggtcag taccgacga acagactggc cticgcgtcc	480

ttcgacgagg acagggtcaa gaacgagctg aagaacggca ggccccggtc cggcgagacg 540
cggcgaggag tggaggccg cgtcggaag gagagcttcg acgaggagaa gggcttccag 600
cggcgcgctg aggtggcgic cgtcatgaac agggccctgg agaacgcca cgacgagagc 660
gcttacctcg acaacctcaa gaaggaactg gcgaacggca acgacgacct gcgcaacgag 720
gacggccgtt ccccggttca ctcggcgctg cggaacacgc cgtccttcaa ggagcggaac 780
ggaggcaatc acgaccgctc caggatgaag gccgtcatct actcgaagca ctctggagc 840
ggccaggacc ggtcgagttc ggccgacaag aggaagtacg gcgaccgga cgccttccgc 900
ccgccccgg gcaccggcct ggtcgacaig tcgagggaca ggaacatcc gcgcagcccc 960
accagccccg gtgagggaat cgtcaatttc gactacggct gggtcgccgc ccagacggaa 1020
gcggacgccg acaagaccgt ctggaccac ggaaatcact atcacgcgc caatggcagc 1080
ctgggtgcca tcatgttca cgagagcaag ttccgcaact ggltcgaggg ttactcgac 1140
ttcgaccgag gagcctatgt gatcaccttc atcccaaga gctggaacac cgccccgac 1200
aaggtaaagc agggctggcc giga 1224

<210> 2

<211> 2393

<212> DNA

<213> Streptomyces mobaraensis

<400> 2

gatcttccgg gacatcigag gcgccggagg cgatccgagg cgcccgaggc gtcgtcgca 60
agggcgccgc cgtgccgtcc atccccgtcc gcgtcgacgc ggcccgaggag ggggtgcggc 120
ggcgcccttc ggctgtgtgg acgaagcgtc gggtcggagg ggccggccgga tatgtcctt 180
ggggcggggt ggccggaatt gccgccatgg tgttgccggg gaatcgacc gaagacatga 240
tcattctcg tatccaccg atcacgtatc cgggagtcga gaagtgttac gccgtgcccc 300

tgiccgcgic ctacccccig tgcctgigac agcgacccgc gtctctccac tcgcacggac 360
ggccccacag gacctttcgg cccgggctcg ccccgccgcc tcggigacgg cctccgaata 420
acgcggccgc cggggcctcg gccggligac cgaiccggt caccgcgcc gccgggcggg 480
cgccacgic cggctcgc ccgcccgaca tcggctgca ctgccctgc tcgcacttct 540
tccgcctcc cggccgcgtt ttccgccgc cgaaggctcg gcgacgcgt cgaatcccc 600
ctcatcgcg acgtgcttc gcacggccgc gttaacgat gtccacgac aaaggagtig 660
caggttcca tgcgcatag ccggagagct ctgctttcg ccactatgag tgcggtgta 720
tgcaccgcc gattcatgcc gtccgccgc gagccgccg ccgacaatgg cgcgggggaa 780
gagacgaagt cctacgccg aacctaccgc ctacggcgg atgacgtgc gaacatcaac 840
gcgcacaac aaagcgctcc ggccgttcg agcgccggcc cgtcgttcg ggccccgac 900
tccgacgaca gggcacccc tccgccgag ccgtcgaca ggaigccga ccgtaccgt 960
ccctcgtac gcagggccga gacggctgc acaactaca tacgcaagt gcagcaggtc 1020
tacagccacc gcgacggcag gaagcagcag atgaccgagg agcagcgga gtggctgtcc 1080
tacggctcg tcgggtcac ctgggtcaat tcgggtcagt acccgacga cagactggcc 1140
ttcgcgtct tcgacgagga caggitcaag aacgagctga agaacggcag gccccgtcc 1200
ggcgagacgc gggcggagti cgagggccgc gtgcgaagg agagcttca cgaggagaag 1260
ggcttcacg gggcgctga ggiggcgtcc gicatgaaca gggccctgga gaacggccac 1320
gacgagagcg ctacctga caacctcaag aaggaactgg cgaacggcaa cgacgccctg 1380
cgcaacgagg acgcccgttc ccgttttac tcggcgtgc ggaacacgc gtcctcaag 1440
gagcggaac gaggcaatca cgaccgtcc aggatgaagg ccgcatcia ctgaagcac 1500
ttctggagcg gccaggaccg gtcgagttc gccgacaaga ggaagtacgg cgaccggac 1560
gccttcgcc ccgccccggg caccggcctg gtgcacatgt cgaggacag gaacattccg 1620

cgcagcccca ccagccccgg tgagggatic gicaatticg actacggctg gticggcgcc 1680
cagacggaag cggacgccga caagaccgic tggaccacg gaaatcacia tcacgcgccc 1740
aatggcagcc tgggigccat gcatgtctac gagagcaagt tccgcaactg gtccgaggtt 1800
tactcggact tcgaccgcgg agcciatgtg atcaccttca tcccaagag ctggaacacc 1860
gccccgaca agglaaagca gggctggcgg tgaatgtgagc ggggtggagg ggagccggtt 1920
gccccgtcc cctccacctt ctccccgcc accacgaaag tcgtacagc tcgtgtccc 1980
tcgtgtctgc gacgtgcgc gggagtctgc cctcgtggcg gtgcgccgtc gtccgggtgc 2040
ccgtgggttc gaacatgagg atggaggcgc ccggggagga cggcttgtgt tcggtgccct 2100
tgggcaccac gaagggtctg ccttgtgtca ggcgcaccgt gtgttccgtt ccgtcggagt 2160
cgccggagcg cactcgaag cggccgtcca ggacaggaa gaactcgtc gtgtcctct 2220
ggacgtgcca gacgtgtcgc cctcgggtgt gggcgacgcg gacgtcgtag tcgttcatgc 2280
ggcgacgat gcgcgggctg tagacgtct cgaaggaggc gagggccttg gcgaggtiga 2340
cgggctcgtt gtcttcatg gtccgagctt cggcgggagc ccgccgcgc gtc 2393

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3
acaccgcact catagtggcg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

tccgtgcgag tggaagaacg

20

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gacggcctcc gaataac

17

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

atgtcgaggg acaggaac

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

caccacgaaa gtcgctac

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/21, C12N9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/21, C12N9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/29187 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 26 April, 2001 (26.04.01), Full text & JP 2001-186884 A & AU 200076867 A & EP 1225217 A1 & BR 200014811 A & US 2002/0187525 A1 & CN 1379812 A	1-24
X	EP 481504 A (AJINOMOTO CO., INC.), 22 April, 1992 (22.04.92), Full text & JP 5-199883 A & US 5420025 A & DE 69116495 E	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30. September, 2003 (30.09.03)Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11473

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 379606 A (AJINOMOTO CO., INC.), 01 August, 1990 (01.08.90), Full text & JP 1-27471 A & US 5156956 A & DE 68917582 E	1-24
A	EP 531717 A2 (HOECHST AG.), 17 March, 1993 (17.03.93), Full text & CA 2075549 A & CZ 9202460 A3 & JP 5-292969 A & US 5328998 A & SK 9202460 A3 & TW 298602 A & KR 253036 B1	1-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C12N 1/15, C12N 1/21, C12N 9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C12N 1/15, C12N 1/21, C12N 9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/29187 A1 (味の素株式会社) 2001.04.26, 全文 & JP 2001-186884 A & AU 200076867 A & EP 1225217 A1 & BR 200014811 A & US 2002/0187525 A1 & CN 1379812 A	1-24
X	EP 481504 A (AJINOMOTO CO INC) 1992.04.22, 全文 & JP 5-199883 A & US 5420025 A & DE 69116495 E	1-24
A	EP 379606 A (AJINOMOTO CO INC) 1990.08.01, 全文 & JP 1-27471 A & US 5156956 A & DE 68917582 E	1-24

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.09.03

国際調査報告の発送日

14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 531717 A2 (HOECHST AG) 1993. 03. 17, 全文 & CA 2075549 A & CZ 9202460 A3 & JP 5-292969 A & US 5328998 A & SK 9202460 A3 & TW 298602 A & KR 253036 B1	1-24